

福尔马林灭活柱状黄杆菌对草鱼免疫相关基因表达的影响

刘毅^{1,2} 隗黎丽¹ 李莉¹ 李楠¹ 姚卫建¹ 聂品¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

2. 江西师范大学生命科学院, 南昌 330022)

摘要: 在本研究中, 将福尔马林灭活的柱状黄杆菌菌苗 (FKG₄) 经腹腔注射免疫草鱼, 以注射灭菌 PBS 作对照, 分别在免疫后 1、7、15 和 28d 提取受免疫鱼和对照鱼肝脏、脾脏和头肾 3 种组织中的总 RNA 并反转录成 cDNA, 利用 Real time PCR 方法对不同组织中 C-反应蛋白 (CRP)、主要组织相容性复合体 I (MHC I)、肿瘤坏死因子 (TNF α)、白介素 1 (IL-1 β)、白介素 8 (IL-8)、I 型干扰素 (IFN I) 等 6 种免疫相关基因的表达进行定量分析。结果发现 CRP 在受免疫鱼肝脏中的表达于免疫后 1、7d 显著高于对照鱼, 而在脾脏与头肾中的表达未出现显著差异; MHC I 在受免疫鱼 3 种组织中的表达于免疫后 1、7、15d 都显著高于对照鱼; TNF α 在 3 种组织中的表达水平都较低, 但都于免疫后 1、7d 显著高于对照鱼; IL-1 β 在 3 种组织中的表达于免疫后 1d 都显著高于对照鱼, 但只有在头肾中的表达在免疫后 7d 时仍保持显著差异; IL-8 在 3 种组织中的表达都只是于免疫后 1d 显著高于对照鱼; TNF α 、IL-1 β 及 IL-8 等 3 种炎症因子的基因表达在免疫后 15d 都恢复到对照鱼的水平; 而 IFN I 在 3 种组织中的表达与对照组之间未出现显著差异。结果表明, FKG₄ 注射免疫可以显著提高草鱼 3 种组织中与抗菌免疫相关的基因表达, 从而增强鱼体抵抗细菌性病原的免疫力。

关键词: 柱状黄杆菌; 草鱼; 免疫相关基因; 实时荧光 PCR; 基因表达

中图分类号: Q344+.13 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)06-0794-08

鱼类的免疫反应具有与高等脊椎动物相类似的基本特征, 包括免疫识别并分解病原, 抗原提呈, 特异性免疫杀伤与清除外来物质等几个阶段^[1]。在鱼类免疫反应的不同阶段, 鱼体的免疫系统会产生各种不同的免疫因子。在抗原识别与反应阶段, 鱼体的巨噬细胞会产生肿瘤坏死因子 α (TNF α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β), 而辅助性 T 细胞会生成白细胞介素-2 (IL-2) 以及干扰素 γ (IFN γ), IL-1 β 会刺激 IL-2 的分泌, 而 IL-2 的分泌可引起 IFN γ 的分泌, 又反过来增强巨噬细胞的吞噬功能^[2]。另一方面, 在鱼类免疫反应的初期, 免疫因子会刺激各种免疫细胞的增殖, 例如 IL-2 会刺激辅助性 T 细胞与杀伤性 T 细胞的增殖, 导致 B 细胞的大量增殖以及抗体的生成, 而在细菌感染被控制以后, 这些免疫效应细胞又会被抑制性 T 细胞所抑制, 以免反应过度造成对自身正常组织的伤害, 这种免疫抑制的过程同样受

免疫因子的调控^[3]。因此, 鱼类免疫反应实际上是受大量不同类型的免疫因子及其基因的表达所调控的, 这些参与调节机体免疫反应的基因称为免疫相关基因^[1]。大量文献报道了接种细菌、病毒、寄生虫及细菌脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 等不同免疫原对鱼体免疫相关基因表达产生的影响。Fast *et al.*^[2] 报道了接种一种商用杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 菌苗后, 两个不同品种鲑鱼肾脏与肝脏中 IL-1 β 、TNF α 及 IL-8 等 3 种基因的表达变化。M cbeath *et al.*^[3] 则报道了用传染性胰脏坏死病毒 (IPNV) 和传染性鲑贫血病毒 (ISAV) 感染大西洋鲑 (*Salmo salar*) 后, 鱼体肾脏中 M α 、I 和 II 型 IFN、 γ 型 IFN 诱导蛋白 (γ IP)、IL-1 β 、TNF α 等多种基因的表达变化。Sigh *et al.*^[4] 则检测了受多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 感染后虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 皮肤中 IL-1 β 、TNF α 、IL-8 及 II 型

收稿日期: 2007-08-15 修订日期: 2008-06-12

基金项目: 中国科学院知识创新工程方向性项目 (KSCX2-SW-302); 国家自然科学基金资助项目 (30130150 30025035); 湖北省科技攻关计划项目 (2006AA201B27) 资助

作者简介: 刘毅 (1971-), 男, 汉族; 江西九江人; 在职博士研究生; 主要从事鱼类免疫学研究。E-mail: yiliu@sinacn.com

通讯作者: 聂品, E-mail: pinini@ih.ac.cn

*IL-1*受体 (*IL-1R II*)等4种基因的表达变化。此外, Goetz *et al.*^[5]还对经大肠杆菌 (*Escherichia coli*) LPS刺激后虹鳟巨噬细胞中各种免疫相关基因的表达进行了分析。这些研究进一步促进了人们对鱼体免疫反应机理的认识。

鱼类柱形病是一种在世界范围内发生的、危害鱼类品种众多的细菌性疾病^[6]。在中国,由柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*)感染导致的细菌性烂鳃病,几乎危害所有的淡水养殖品种,尤以草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)为甚,每年因发生细菌性烂鳃病而造成的经济损失十分巨大^[7]。针对该病原所进行的免疫学研究资料还很缺乏,已有的资料表明,柱状黄杆菌外膜蛋白与脂多糖对鳊 (*Siniperca chuatsi*)具有强免疫原性^[8],注射接种酚灭活的柱状黄杆菌可以有效提高鳊外周血白细胞的吞噬活性^[9],注射接种福尔马林灭活的柱状黄杆菌 G_4 (FKG₄)显著提高草鱼脾脏和头肾中 IgM 与 IgD 的基因表达 (Liu *et al.* 未发表)。注射接种 FKG₄对草鱼免疫相关基因表达的影响,尚未见报道。

本研究以 NCBI数据库中已有的草鱼 *CRP*、*MHC I*、*TNF α* 、*IL-1 β* 、*IL-8*及 *IFN I*等6种免疫相关基因 cDNA 序列为模板设计引物,采用 Real-time PCR 技术,定量分析了用 FKG₄接种后,草鱼肝、脾、头肾中上述6种免疫相关基因的表达变化。

1 材料与方法

1.1 细菌的培养及实验鱼 菌株 *F. columnare G₄*由中国科学院水生生物研究所提供。该菌的培养条件及培养基配方参考文献 [10]。用于本研究的草鱼购自湖北省水产科学研究所基地,所有草鱼放在实验室自动充气水循环系统中人工饲养两周,水温保持 (25±1)℃,每日投喂约 1% 鱼体体重的人工配合饲料。选取体表健康、体重为 25—30g 的草鱼,分别置于两个体积约为 150L 的圆柱形水缸中饲养,每缸放 40尾,饲养条件同前。

1.2 FKG₄的制备及免疫注射 取 25℃振荡培养 48h 后的 100mL 细菌培养液,11000r/min 离心 10min 沉淀用灭菌磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.2)清洗三次,用含 1.0% 福尔马林的 PBS 重新悬浮,室温下放置 24h。灭活后的细菌悬浮液再次以 11000r/min 离心 10min,用灭菌 PBS 清洗两次以去除福尔马林,最后用灭菌 PBS 稀释到约 1.0×10^8 cells/mL,制备好的 FKG₄菌苗置于 4℃冰箱备用。

免疫注射前,将 FKG₄菌苗取出升温到室温,两

组实验鱼用 MS222 溶液 (1mg/L)麻醉,其中一组作为免疫组,每尾草鱼经胸鳍下注射 0.1mL 的 FKG₄,另一组则每尾注射同等剂量的灭菌 PBS 作为对照组。

1.3 总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成 用 TRIzol (Invitrogen) 试剂,分别于免疫注射后 1、7、15 和 28d 提取免疫组 (各 5尾)草鱼肝脏、脾脏及头肾三种组织中的总 RNA (对照组 5尾,于注射后 7d 提取),并用无 RNase 活性的 DNase (Takara) 处理以去除其中的基因组 DNA。纯化后的总 RNA (2 μ g)用 Power-script II 反转录酶 (Clontech) 反转录成 cDNA, cDNA 合成反应的最终体积为 20 μ L。所有 cDNA 样品保存于 -20℃,以备 real-time PCR 检测时使用。

1.4 Real-time PCR 采用 Primer Premier 5.0 软件设计用于 Real-time PCR 中的引物 (表 1),引物设计所依据的基因模板序列均来源于 NCBI DNA 数据库,各基因 NCBI 登录号分别为 *CRP* (B028455)、*MHC* (AY391782)、*TNF α* (EU047718)、*IL-1 β* (EU047716)、*IL-8* (EU047717)、*IFN I* (AB196166)、 *β -actin* (M25013)。各基因的 PCR 产物用 DNA 胶提纯试剂盒 (Qiagen) 进行纯化后,克隆进入载体 pTA2 (Takara),克隆产物经测序后确认克隆成功。质粒 DNA 用质粒微量纯化试剂盒 (Qiagen) 进行纯化,用于制作标准浓度曲线 (曲线的斜率应在 -3.6 与 -3.2 之间,相关系数应大于 0.96),cDNA 质粒溶液的浓度以 OD₂₆₀ 光密度下进行测定,相应的基因拷贝数按 1 μ g 的 1000bp DNA 约等于 9.1×10^9 分子的公式进行换算^[11]。

定量的 real-time PCR 在 Chemo4 RealTime (MJ Research) 上进行,所用反应试剂为 Real-time PCR Master Mix (Toyobo)。在总体积为 20 μ L 的反应液体中,含有 10 μ L 的反应混合液,2.0 μ L 的模板 cDNA,7.2 μ L 的无菌水以及各 0.4 μ L 的正向与反向引物 (引物的浓度为 10 μ mol/L)。反应的条件如下:95℃变性 4min;95℃ 30s;58℃ 25s;72℃ 30s 反应 40 个循环;72℃ 5min 结束。以每次反应结束后进行的扩增产物的熔解曲线分析来确认该产物是否单一,最后分别利用各特异基因的标准曲线算出样品中的基因拷贝数。

1.5 数据分析 各特异性免疫相关基因的表达与其与 *β -actin* 的比值进行统计分析。所有数值均为平均值 ± 标准差。免疫组与对照组之间特异性基因表达的差异用 SPSS 软件 (11.5) 中的单向方差分析法 (ANOVA) 进行分析, $p < 0.05$ 为显著性差异。

表 1 Real time PCR 中所用引物

Tab. 1 Primers used in real time PCR

引物名 Primer	引物序列 Sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	扩增片段大小 Amplikon size (bp)	NCBI 登陆号 Accession number
β -actin-F	CCTTCTTGGG TAGGAG TCTTG	58	221	M 25013
β -actin-R	AGAGTA TTTA CG CTCAG GTGGG			
CRP-F	GTGTG GATGA CAA TGTGT GTGAAG	60	132	AB028455
CRP-R	AGGAA CCGTATGTG CCAAAGGG AA			
MHC I -F	CCTG GCA GAAAA TGGACAAG	58	271	AY391782
MHC I -R	CCAA CAA CA CCAATG ACA ATC			
TNF α -F	TGTG CCGCCGCTGT CTG CTCA CG CT	60	291	EU 047718
TNF α -R	GATGAGGAAAGA CACCTGGCTG TAGA			
IL-1 β -F	GGAGAA TGTGA TCGAAGAG CGT	60	448	EU 047716
IL-1 β -R	GCTGATAA ACCA TCCGG GA			
IL-8-F	AGGTCTG GGTGTA GATCCACGCTG	58	137	EU 047717
IL-8-R	TTAGTGTGAAA ACTCACATGATCTCT			
IFN I -F	GGTGAA GTTTCTGTCCTGACCTTAG	60	173	AB196166
IFN I -R	CCTTATGTGATGG CTG GTATGGG			

2 结果

2.1 CRP 在各组织中的表达

免疫组草鱼肝脏中 CRP 的表达于免疫后 1d 即迅速上升了近 10 倍, 直到免疫后 7d 仍显著性高于对照

组(图 1A), 表达的最高峰值出现在免疫后 1d 其后随着时间的推移其表达逐步下降。与肝脏相比, 草鱼脾脏和头肾中 CRP 的结构性表达相对较低(其平均值均低于肝脏的 1.0%), 且免疫后在两种组织中的 CRP 表达与对照组之间未出现显著性差异(图 1B)。

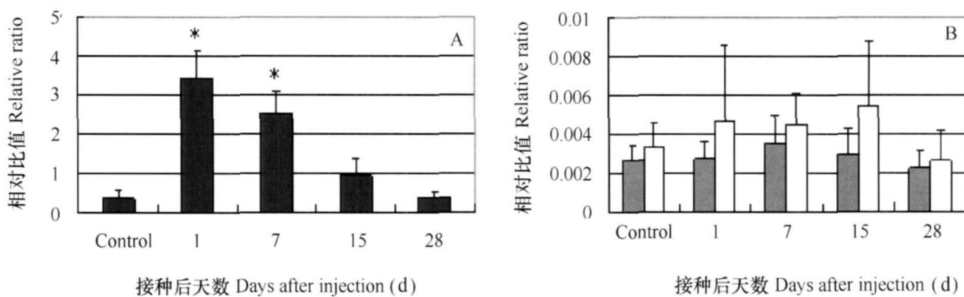


图 1 腹腔注射福尔马林灭活柱状黄杆菌 G_4 后草鱼肝脏(■)、脾脏(■)和头肾(□)中 CRP 基因的表达

Fig. 1 Gene expression of CRP relative to β -actin in liver(■), spleen(■) and head kidney(□) of grass carp at 1, 7, 15 and 28 days post intraperitoneal injection of formalin-killed *F. columnare* strain G_4

组织中总 RNA 的提取时间分别为免疫后 1、7、15 及 28d; CRP 拷贝数除 β -actin 拷贝数均一化; 各组数据以平均值 \pm 标准差显示 ($n=5$); 星号表示该免疫组与对照组之间具有显著性差异 ($p < 0.05$)

Data are expressed as mean \pm S. E. ($n=5$). Control fish were injected with sterile PBS. Asterisks indicate the significant difference from the control at $p < 0.05$

2.2 MHC I 在各组织中的表达

MHC I 在草鱼 3 种组织中的表达变化(图 2)。草鱼在免疫后 1d 其 3 种组织中的 MHC I 表达即显著性高于对照组, 到免疫后 7d 达到最高峰, 至免疫后 15d 有所下降, 不过仍显著高于对照组, 至免疫后 28d 与对照组之间无显著差异。受免鱼 3 种组织中, 以脾脏中的 MHC I 表达峰值为最高, 头肾其

次, 肝脏最低。

2.3 TNF α 在各组织中的表达

TNF α 在草鱼 3 种组织中的表达水平都相对较低(图 3)。免疫后 1d TNF α 在鱼体 3 种组织中的表达都迅速升高, 显著高于对照组, 直到免疫后 7d 它们与对照组之间仍保持显著差异, 至免疫后 15d 与 28d 3 种组织中的表达都随着时间的推移而下降, 且与对照组之

间无显著性差异。受免鱼 3 种组织中, 以脾脏中的 *TNF α* 表达峰值为最高, 头肾其次, 肝脏最低。

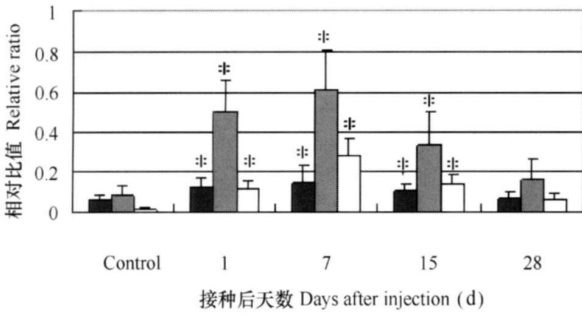


图2 腹腔注射福尔马林灭活柱状黄杆菌 G_4 后草鱼肝脏(■), 脾脏(■)和头肾(□)中 *MHC I* 基因的表达

Fig. 2 Gene expression of *MHC I* relative to β -actin in liver(■), spleen(■) and head kidney(□) of grass carp at 1, 7, 15 and 28 days post intraperitoneal injection of formalin-killed *F. columnare* strain G_4 组织中总 RNA 的提取时间分别为免疫后 1, 7, 15 及 28d; *MHC I* 拷贝数除 β -actin 拷贝数均一化; 各组数据以平均值 \pm 标准差显示 ($n = 5$); 星号表示该免疫组与对照组之间具有显著性差异 ($p < 0.05$) Data are expressed as mean \pm S. E. ($n = 5$). Control fish were injected with sterile PBS. Asterisks indicate the significant difference from the control at $p < 0.05$

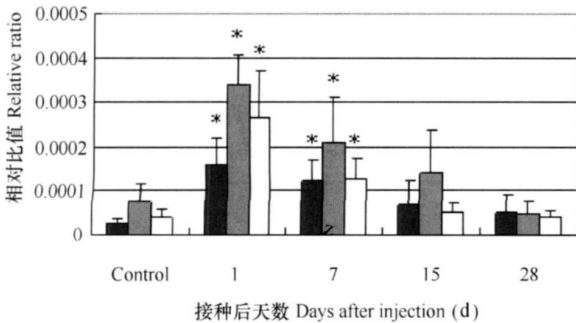


图3 腹腔注射福尔马林灭活柱状黄杆菌 G_4 后草鱼肝脏(■), 脾脏(■)和头肾(□)中 *TNF α* 基因的表达

Fig. 3 Gene expression of *TNF α* relative to β -actin in liver(■), spleen(■) and head kidney(□) of grass carp at 1, 7, 15 and 28 days post intraperitoneal injection of formalin-killed *F. columnare* strain G_4 组织中总 RNA 的提取时间分别为免疫后 1, 7, 15 及 28d; *TNF α* 拷贝数除 β -actin 拷贝数均一化; 各组数据以平均值 \pm 标准差显示 ($n = 5$); 星号表示该免疫组与对照组之间具有显著性差异 ($p < 0.05$) Data are expressed as mean \pm S. E. ($n = 5$). Control fish were injected with sterile PBS. Asterisks indicate the significant difference from the control at $p < 0.05$

2.4 *IL-1 β* 在各组织中的表达

IL-1 β 在草鱼 3 种组织中的表达变化 (图 4)。由图 4 可以看出, 免疫后 1d 3 种组织中的 *IL-1 β* 表达都明显上升, 显著性高于对照组, 然而至免疫后

7d 除头肾中的表达继续保持与对照组之间的显著差异外, 其他两个组织中的表达又迅速下降到与对照相当的水平。受免鱼 3 种组织中, 脾脏的 *IL-1 β* 表达峰值最高, 头肾其次, 两种组织中的 *IL-1 β* 表达峰值皆远高于肝脏。

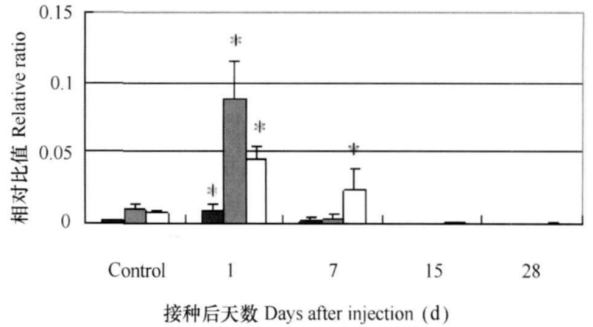


图4 腹腔注射福尔马林灭活柱状黄杆菌 G_4 后草鱼肝脏(■), 脾脏(■)和头肾(□)中 *IL-1 β* 基因的表达

Fig. 4 Gene expression of *IL-1 β* relative to β -actin in liver(■), spleen(■) and head kidney(□) of grass carp at 1, 7, 15 and 28 days post intraperitoneal injection of formalin-killed *F. columnare* strain G_4 组织中总 RNA 的提取时间分别为免疫后 1, 7, 15 及 28d; *IL-1 β* 拷贝数除 β -actin 拷贝数均一化; 各组数据以平均值 \pm 标准差显示 ($n = 5$); 星号表示该免疫组与对照组之间具有显著性差异 ($p < 0.05$) Data are expressed as mean \pm S. E. ($n = 5$). Control fish were injected with sterile PBS. Asterisks indicate the significant difference from the control at $p < 0.05$

2.5 *IL-8* 在各组织中的表达

IL-8 在草鱼 3 种组织中的结构性表达水平十分接近 (图 5)。免疫后 1d 免疫组草鱼 3 种组织中的

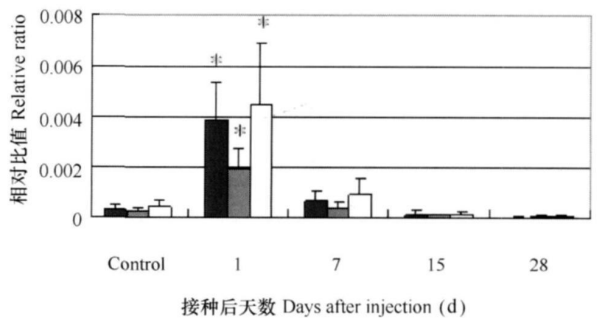


图5 腹腔注射福尔马林灭活柱状黄杆菌 G_4 后草鱼肝脏(■), 脾脏(■)和头肾(□)中 *IL-8* 基因的表达

Fig. 5 Gene expression of *IL-8* relative to β -actin in liver(■), spleen(■) and head kidney(□) of grass carp at 1, 7, 15 and 28 days post intraperitoneal injection of formalin-killed *F. columnare* strain G_4 组织中总 RNA 的提取时间分别为免疫后 1, 7, 15 及 28d; *IL-8* 拷贝数除 β -actin 拷贝数均一化; 各组数据以平均值 \pm 标准差显示 ($n = 5$); 星号表示该免疫组与对照组之间具有显著性差异 ($p < 0.05$) Data are expressed as mean \pm S. E. ($n = 5$). Control fish were injected with sterile PBS. Asterisks indicate the significant difference from the control at $p < 0.05$

*IL-8*表达都明显上升,并显著性高于对照组,至免疫后 7d 各组织中的表达又迅速下降至与对照组草鱼相当的水平。受免鱼 3种组织中,头肾与肝脏中的 *IL-8*表达峰值比较接近,且皆高于脾脏。

2.6 *IFN I* 在各组织中的表达

IFN I 在 3种组织中的结构性表达水平较低,都低于 β -*actin* 的 5‰(图 6)。免疫组草鱼 3种组织中的 *IFN I* 表达变化幅度都很小,在免疫后 1、7、15、28d 所检测的相对比值与对照组之间都无明显差异。受免鱼 3种组织中,以头肾中的 *IFN I* 表达峰值稍高,脾脏其次,肝脏稍低。

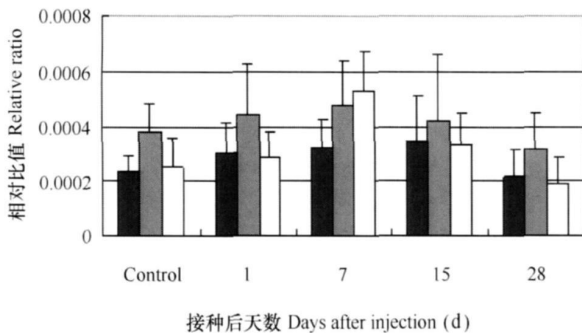


图 6 腹腔注射福尔马林灭活柱状杆菌 G_4 后草鱼肝脏(■),脾脏(■)和头肾(□)中 *IFN I* 基因的表达

Fig. 6 Gene expression of *IFN I* relative to β -*actin* in liver (■), spleen (■) and head kidney (□) of grass carp at 1, 7, 15 and 28 days post intraperitoneal injection of formalin-killed *F. columnare* strain G_4 组织中总 RNA 的提取时间分别为免疫后 1、7、15、28d; *IFN I* 拷贝数除 β -*actin* 拷贝数均一化; 各组数据以平均值 \pm 标准差显示 ($n = 5$); 星号表示该免疫组与对照组之间具有显著性差异 ($p < 0.05$)
Data are expressed as mean \pm S. E. ($n = 5$). Control fish were injected with sterile PBS. Asterisks indicate the significant difference from the control at $p < 0.05$

3 讨论

硬骨鱼类是低等的脊椎动物,它不仅拥有较强的先天免疫力,而且和哺乳类、鸟类等高等脊椎动物一样,能够产生获得性免疫。研究资料表明,硬骨鱼类的免疫系统中,既含有识别抗原所必需的抗原受体(包括膜抗体和 T 细胞受体),也含有抗原提呈所需的主要组织相容性复合体分子,因而利用免疫的手段提高鱼类的获得性免疫力以防治鱼病是可行的^[12]。另一方面,鱼体先天免疫系统中的细胞对于激活获得性免疫反应所起的作用是非常关键的因素,这些细胞所分泌的致炎细胞因子,有吸引炎性细胞和抗原提呈细胞的作用,后者则会分泌大量的具免疫调节功能的细胞因子^[13]。已经证实接种 FKG_4

可以显著提高草鱼脾脏与头肾中 IgM 与 IgD 的表达,表明其对草鱼的获得性免疫力有上调作用(未发表),本文则首次报道了接种 FKG_4 对草鱼肝脏、脾脏和头肾中 *CRP*、*MHC I*、*TNF α* 、*IL-1 β* 、*IL-8* 及 *IFN I* 等 6 种免疫相关基因表达的影响。

作为一种典型的急性反应蛋白,CRP 由动物的肝脏产生,在很多动物种类甚至是无脊椎动物体内被发现。当人类和大多数动物遭受组织损伤、病原菌感染或发炎时,最早出现在血浆的蛋白质就是 CRP ^[14]。CRP 的生物学功能十分广泛,包括在 Ca^{2+} 的存在下,识别和沉淀细菌胞壁中的 C-多糖并通过经典途径激活补体系统^[15],以及与自身的或外源的毒性物质结合等^[16]。人体 CRP 的变化常作为一项生理指标,被用来评价人体的生理状况^[17],以及是否与某种特定的疾病相联系^[18]。鱼体 CRP 的变化则通常作为反应免疫状况的指标,被用来评价各种环境因素对鱼体健康所造成的影响。Paul *et al.*^[19] 发现将厚唇鲃 (*Catla catla*) 浸于含镉或汞的溶液中 12—24h 鱼体外周血中 CRP 水平上升了 2.8—3.5 倍。Sinha *et al.*^[20] 也发现将南亚野鲮 (*Labeo rohita*) 浸于非致死浓度下的酚溶液中,其血清中的 CRP 水平提高了 3—5 倍。Liu *et al.*^[21] 则证明注射松节油后 1—14d 内,虹鳟的外周血及肝脏、头肾和脾脏中的 *CRP* 表达显著降低。本研究发现,经 FKG_4 注射免疫后 1d 草鱼肝脏中的 *CRP* 基因表达即迅速上升了将近 10 倍,而脾脏与头肾中 *CRP* 基因表达则未见显著变化。

经过抗原提呈细胞加工后的抗原会结合到细胞膜上的 MHC I 或 II 分子,一般来说,由细胞内病原降解所产生的内源性多肽会结合到 MHC I 类分子上,被提呈给细胞毒性 T 细胞,而来源于细胞外的抗原多肽则会结合到 MHC II 类分子上,并被提呈给辅助性 T 细胞^[22]。鱼类的 MHC I 和 II 分子自 20 世纪 90 年代后在多种鱼类被克隆^[23,24],但迄今为止对它们的功能及表达调控还知之甚少。在基因水平,*MHC I* 在所有的有核细胞中表达,并有可能受温度、颗粒性抗原(如病毒,细菌等)以及内源性可溶蛋白(如细胞因子、生长因子等)的影响^[25-27]。Takano *et al.*^[28] 发现通过肌肉注射一种抗病毒的 DNA 疫苗免疫牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*),在免疫后 1d 和 7d 鱼体的 *MHC I α* 、*II α* 、*II β* 及 *TCR- α* 等免疫相关基因的表达都至少比对照鱼升高了两倍。本研究的结果显示,经 FKG_4 腹腔注射免疫后,草鱼肝脏、脾脏与头肾中的 *MHC I* 基因表达都快速上

调,从免疫后 1d 开始显著高于对照鱼,并保持到免疫后 15d,表明注射 FK_{G4}能使草鱼的抗原提呈能力得到增强,从而激活鱼体的获得性免疫力。遗憾的是,草鱼 MHC II 序列尚未被克隆,无法检测到 FK_{G4}对草鱼体内 MHC II 基因表达的影响。

单核吞噬细胞 (MC) 分泌的 TNF α 、IL-1 β 及 IL-8 是引起炎症反应、抵抗细菌感染的 3 种主要介质,其中, TNF α 与 IL-1 β 主要由细菌 LPS 诱导,是炎症反应的第一介质,而 IL-8 则由 LPS 或 TNF α 和 IL-1 β 刺激单核细胞产生,是炎症反应的第二介质^[29]。对虹鳟和鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 的研究表明,鱼体 TNF α 及 IL-1 β 的基因表达同样会被细菌 LPS 诱导产生^[30,31]。Fast *et al.*^[2] 用杀鲑气单胞菌菌苗通过腹腔注射免疫幼龄大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*),免疫 24h 后,鱼体肾脏和肝脏中 IL-1 β 、TNF- α 及 IL-8 等基因的表达都显著高于对照鱼。Sigh, *et al.*^[4] 则检测了经多子小瓜虫感染 4d 后的虹鳟皮肤、头肾及脾脏中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-8 及 IL-1R II (IL-1 受体 II) 等细胞因子的基因表达,发现除了 IL-1R II 的基因表达下调外,另外 3 种基因的表达都显著上调。本研究中,经 FK_{G4} 免疫后 1d,草鱼肝脏、脾脏与头肾中的 TNF α 、IL-1 β 及 IL-8 基因表达都显著高于对照鱼,直到免疫后 7d 3 种组织中 TNF α 的表达及头肾中 IL-1 β 的表达还明显高于对照鱼,表明草鱼的免疫系统已经对进入体内的 FK_{G4} 产生了强烈的炎症反应,这对于增强鱼体免疫力,最终清除外来的细菌性病原是十分必要的。

近年来对鱼类 IFN 的研究取得明显的突破, I 型 IFN 和 γ 型 IFN 分别在几种鱼类中得到克隆,而且人们发现鱼类的 I 型 IFN 与高等脊椎动物之间存在高度的相似性^[32]。I 型 IFN 与 γ 型 IFN 都由病毒感染所诱导,且具有抑制病毒复制的生物学活性,不同之处在于,前者是在病毒感染早期由单核吞噬细胞产生,而后者则是机体发挥免疫作用之后由病毒抗原刺激致敏的 T 淋巴细胞所产生^[29]。McBeath, *et al.*^[3] 发现分别用传染性胰腺坏死病毒 (IPNV) 和传染性贫血病毒 (ISAV) 进行腹腔注射免疫 6d 后,大西洋鲑肾组织中的 I 型 IFN 与 γ 型 IFN 的表达都大幅上升,而对鱼体 TNF α 的表达无影响。本研究则发现,用 FK_{G4} 免疫后,草鱼体内 TNF α 的表达明显上调, I 型 IFN 的表达则未能检测到显著变化,表明鱼体对细菌和病毒两种病原物质的免疫反应不同,注射免疫 FK_{G4} 对草鱼抵抗病毒感染的免疫力影响不明显。

参考文献:

- [1] Kono T, Ponpompisita A, Saka iM. The analysis of expressed genes in head kidney of common carp *Cyprinus carpio* L. stimulated with peptidoglycan [J]. *Aquaculture*, 2004, **235**: 37-52
- [2] Fast M D, Johnson S C, Jones S R M. Differential expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β -1, TNF α -1 and IL-8 in vaccinated pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) and chum (*Oncorhynchus keta*) salmon juveniles [J]. *Fish Shellfish Immunol* 2007, **22**: 403-407
- [3] McBeath A J, Snow M, Secombes C J *et al.* Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, **22**: 230-241
- [4] Sigh J, Lindström T, Buchmann K. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, **17**: 75-86
- [5] Goetz F W, Hlev D B, McCauley L A R, *et al.* Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages [J]. *Mol Immunol*, 2004, **41**: 1199-1210
- [6] Plumb J A. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes [M]. Ames IA: Iowa State University Press, 1999, 184-189
- [7] Sun B, J Nie P. Outer membrane protein and lipopolysaccharide of *Cytophaga columnaris* and their immunogenicity to the mandarin fish *Siniperca chuatsi* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**: 524-527 [孙宝剑, 聂品. 柱状嗜纤维菌的外膜蛋白和脂多糖及其对鳊的免疫原性. 水生生物学报, 2001, **25**: 524-527]
- [8] Chen C F, Li J, Kusuda R. Studies on efficiency of immersion immunity against bacterial gill rot disease in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1996, **15**: 257-262 [陈昌福, 李静, 楠田理一. 浸泡免疫预防草鱼细菌性烂鳃病效果的研究. 华中农业大学学报, 1996, **15**: 257-262]
- [9] Chen C F, Shi W Z, Li J *et al.* A preliminary study on the immune response against *Cytophaga columnaris* of mandarin fish (*Siniperca chuatsi* B.) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1995, **14**: 377-380 [陈昌福, 史维舟, 李静, 等. 柱状嗜纤维菌免疫反应的初步研究. 华中农业大学学报, 1995, **14**: 377-380]
- [10] Liu Y, Xie H X, Chang M X, *et al.* Immunologic enhancement of *Flavobacterium columnare* exopolysaccharide in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, **30**: 683-689 [刘毅, 谢海侠, 昌鸣先, 等. 柱状黄杆菌胞外多糖对草鱼的免疫促进作用. 水产学报, 2006, **30**: 683-689]
- [11] Overbergh L, Gilietti A, Valckx D, *et al.* The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression [J]. *J Biol Tech*, 2003, **14**: 33-43
- [12] Fletcher T C, Secombes C J. Immunology of fish [A]. In *Nature*

- Encyclopedia of Life Sciences [M]. London: Nature Publishing Group, 1999: 688—698
- [13] Fearon D T. Seeking wisdom in innate immunity [J]. *Nature*, 1997, 388: 323—324
- [14] Iwana G, Nakanishi T. The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment [M]. San Diego: Academic Press, 1996: 63—104
- [15] Hack C E, Wolbink G J, Schalkwijk C, *et al*. A role for secretory phospholipase A2 and C-reactive protein in the removal of injured cells [J]. *Immunity Today*, 1997, 18: 111—115
- [16] Du CbsT W. C-reactive protein reacts with the U1 small nuclear ribonucleoprotein [J]. *J Immunol*, 1989, 143: 2553—2559
- [17] Ni K, Hozawa A, Kuriyama S, *et al*. Dietary long-chain n-3 fatty acids of marine origin and serum C-reactive protein concentrations are associated in a population with a diet rich in marine products [J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 84: 223—229
- [18] Nettleton J A, Steffen L M, Mayer-Davis E J, *et al*. Dietary patterns are associated with biochemical markers of inflammation and endothelial activation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) [J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83: 1369—1379
- [19] Paul I, Mandal C, Mandal C. Effect of environmental pollutants on the C-reactive protein of a freshwater major carp, *Catla catla* [J]. *Dev Comp Immunol*, 1998, 22: 519—532
- [20] Sinha S, Mandal C, Allen A K, *et al*. A cute phase response of C-reactive protein of *Labeo rohita* to aquatic pollutants is accompanied by the appearance of distinct molecular forms [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 396: 139—150
- [21] Liu Y C, Iwasaki T, Watarai S, *et al*. Effect of turpentine oil on C-reactive protein (CRP) production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 17: 203—210
- [22] Marieb E N. Human anatomy and physiology [M]. 6th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2004: 185—196
- [23] Dixon B, Stet R J M. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleostean fish [J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25: 683—699
- [24] Grimholt Y, Lie O. The major histocompatibility complex in fish [J]. *Rev Sci Tech*, 1998, 17: 121—127
- [25] Rodrigues P N, Dixon B, Roelofs J, *et al*. Expression and temperature-dependent regulation of the beta2-microglobulin (Cyca-B2m) gene in a cold-blooded vertebrate, the common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Dev Immunol*, 1998, 5: 263—275
- [26] Koppang E O, Dannevig B H, Lie J, *et al*. Expression of MHC class I and II mRNA in a macrophage-like cell line (SHK-1) derived from Atlantic salmon *Salmo salar* L., head kidney [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1999, 9: 473—489
- [27] Park K C, Osborne J A, Tsoi S C, *et al*. Expressed sequence tags analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) liver, kidney and spleen tissues following vaccination against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 18: 393—415
- [28] Takano T, Iwahori A, Hirono I, *et al*. Development of a DNA vaccine against herring rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 17: 367—374
- [29] Liu J X, Zheng C X. Current immunology-cellular and molecular basis [M]. Tsinghua University Press, 2002: 307—316 [刘建欣, 郑昌学. 现代免疫学-免疫的细胞和分子基础. 清华大学出版社, 2002: 307—316]
- [30] Laing K J, Wang T H, Zou J, *et al*. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor- α [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 1315—1322
- [31] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, *et al*. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2000, 10: 229—242
- [32] Robertsen B. The interferon system of teleost fish [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20: 172—191

EFFECT OF FORMALIN INACTIVATED *FLAVOBACTERIUM COLUMNARE* ON EXPRESSION OF IMMUNE RELATED GENES IN GRASS CARP, *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

LIU Yi^{1,2}, WEI Li¹, LI Li¹, LIN an¹, YAO Wei-jian¹ and NIE Pin¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072

2. College of Life Science Jiangxi Normal University, Nanchang 330022)

Abstract Immune responses of fish are normally regulated by various cytokines and their encoding genes which are generally called immune related genes. Expressions of different immune related genes of fish were previously proved to be effected by vaccination with various pathogens including bacteria, viruses, parasite and so on. In the present study, the expressions of six immune related genes in liver, spleen and head kidney of grass carp, i.e. C-reactive protein (CRP), major histocompatibility complex I (MHC I), tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-8 (IL-8) and interferon I (IFN I) as well were quantified using quantitative real-time polymerase chain reaction at 1, 7, 15 and 28 days post intraperitoneal injection (dpi) with formalin killed *Flavobacterium columnare* G₄ (FKG₄), respectively. Control fish were injected intraperitoneally with sterile phosphate buffer solution (PBS). The gene expression of CRP in liver of grass carp was detected at a higher level than that in either spleen or head kidney of fish, and was elevated significantly by vaccination with FKG₄ at 1 and 7 dpi with the highest expression being observed at 1 dpi. By contrast, the gene expression of CRP in either spleen or head kidney of fish was detected at a relatively low level with no significant difference being observed between vaccinated and control fish at all four detected time points. Significant higher gene expression of MHC I was observed at 1, 7 and 15 dpi in all three detected tissues of vaccinated fish when compared with control fish, while its gene expression at 28 dpi showed no significant difference between vaccinated and control fish. Gene expression of TNF α in all three detected tissues of fish was detected at a quite low level with a significant higher gene expression being observed at 1 and 7 dpi in detected tissues of vaccinated fish compared with control fish, and its gene expression in three tissues of vaccinated fish at 15 and 28 dpi are at the same level as that of control fish. Gene expressions of IL-1 β in liver and spleen of vaccinated fish were significantly enhanced at 1 dpi and then down-regulated to control level at 7, 15 and 28 dpi while its gene expression in head kidney was significantly elevated at 1 and 7 dpi and then decreased to control level at 15 and 28 dpi. Gene expressions of IL-8 in three tissues of vaccinated fish were significantly up regulated at 1 dpi and then down regulated to control expression level in all detected tissues at 7, 15 and 28 dpi. However, the gene expression of IFN I on the other hand, did not change significantly in all three detected tissues of vaccinated fish at four time points, although a slight increase of gene expression of IFN I in these tissues was also noticed at 1, 7 and 15 dpi. It is suggested that vaccination of FKG₄ be rather effective on increasing expressions of immune related genes in grass carp which are mainly related to the fish immunity against infection of bacterial pathogen.

Key words *Flavobacterium columnare*; *Ctenopharyngodon idellus*; Immune related genes; Real time PCR; Gene expression